

木粉의 Autohydrolysis後 탈리그닌處理가
纖維素基質의 收率, 리그닌含量과
酵素加水分解에 미치는 影響¹

朴 鍾 文² · 安 元 榮² · 辛 東 韶²

**Effect of Delignification Treatment after Autohydrolysis
on Yields of Cellulosic Substrates, Lignin Contents,
and Enzymatic Hydrolysis¹**

Jong Moon Park² · Won Yung Ahn² · Dong So Shin²

Summary

This experiment was carried out to investigate the effects of autohydrolysis and extraction conditions on the separation of the chemical substances, the extractability of lignin by dioxane, and the yield of reducing sugars from cellulosic substrates by using a commercial cellulase derived from *Trichoderma viride*. Air-dried wood meals through 0.42mm (40 mesh) screen and retained on 0.25 mm (60 mesh) of *Populus alba-glandulosa* and *Pinus koraiensis* were autohydrolyzed with water at 180°C for 30 and/or 60 minutes in a 6 liter stainless-steel digester with or without 2% 2-naphthol. The hydrothermally-treated wood meals were extracted the lignin with 100%, 90%, 75% and 50% dioxane solutions at 70°C for 4 hours, respectively. The results obtained were as follows: 1) After autohydrolysis of *Populus alba-glandulosa*, the yield of wood meals decreased with lengthening the autohydrolysis time from 30 minutes to 60 minutes and with 2% 2-naphthol addition. In case of *Pinus koraiensis*, the yield was not affected by 2%, 2-naphthol addition at the autohydrolysis in the digester. 2) After autohydrolysis and lignin extraction of *Populus alba-glandulosa*, the yield of wood meals decreased with lengthening the autohydrolysis time from 30 minutes to 60 minutes and with 2% 2-naphthol addition. Extraction of 50% dioxane solution was the best solvent for the yield among the solutions of 100%, 90%, 75% and 50% dioxane. In case of *Pinus koraiensis*, the yield was not affected by 2% 2-naphthol addition and the solution of 90% dioxane was the poorest solvent for the yield. 3) After autohydrolysis and lignin extraction of *Populus alba-glandulosa*, the Klason lignin content in cellulosic substrates for enzymatic hydrolysis decreased with lengthening the autohydrolysis time from 30 minutes to 60 minutes and with 2% 2-naphthol addition. Klason lignin content was the lowest after extraction by 90% or 75% dioxane solution. The content was also affected by interaction of the three factors-autohydrolysis time, 2% 2-naphthol addition and concentration of dioxane. In case of *Pinus koraiensis*, the Klason lignin content increased with 2% 2-naphthol addition but was not affected by the concentration of dioxane solution. 4) After autohydrolysis and lignin extraction of *Populus alba-glandulosa*, the extractable Klason lignin content by extraction increased with lengthening the autohydrolysis time from 30 minutes to 60 minutes and with 2% 2-naphthol addition. The extractable lignin

¹接受 7 月 26 日 Received July 26, 1984.

²서울대학교 農科大學 College of Agriculture, Seoul National University, Suwon 170, Korea.

content was the highest after extraction by 90% or 75% dioxane solution. In case of *Pinus koraiensis*, the extractable lignin content increased with 2% 2-naphthol addition. Extractions by 100%, 90% and 50% dioxane solutions were more effective for the extraction of Klason lignin than by 75% dioxane solution. 5) After autohydrolysis and lignin extraction of *Populus alba-glandulosa*, the yield of reducing sugars increased with lengthening the autohydrolysis time from 30 minutes to 60 minutes but was not affected by 2% 2-naphthol addition and the concentration of dioxane. The yield of reducing sugars after enzymatic hydrolysis was slightly higher by extractions with 90%, 75% and 50% dioxane solutions than with 100% dioxane. In case of *Pinus koraiensis*, the yield of reducing sugars was not affected by 2% 2-naphthol addition but affected by the concentration of dioxane. The yield of reducing sugars was the highest in cellulosic substrates extracted by 100% dioxane solution.

Key words: *Trichoderma viride*, *Populus alba-glandulosa*, *Pinus koraiensis*, autohydrolyze, hydrothermally-treated wood meal, dioxane extraction.

1. 緒 論

人口가 增加하고 石油資源이 限り 없는 將來에 枯渴될 것으로 豫見됨에 따라 代替資源 開發에 많은 關心을 갖게 되었다. 태양 에너지를 利用한 光合成에 의하여 每年 1,000 億 톤의 炭素가 固定되며 이 중 약 折半이 纖維素로 生成되어 大量으로 얻을 수 있어 이 纖維素資源을 效率적으로 可用 狀態로 分離 및 轉換할 수 있는 技術을 開發한다면 代替資源으로 더욱 脚光을 받을 것이다. 특히 森林은 태양 에너지 固定效率面에서 다른 炭素 固定 有機體보다 有利하며, 相對적으로 量도 많다. 그러므로 森林은 地球上 天然 有機體의 再生源이다. 森林을 이루는 木材는 그 化學的 組成이 概略적으로 65%의 多糖類, 25%의 리그닌, 10%의 抽出物로 構成되어 있어 各成分을 效率적으로 分離하거나 微生物을 利用한 酵素加水分解로 纖維素物質을 六炭糖, 五炭糖과 같은 單糖類로 만들어 이 加水分解物을 化學的 또는 生物學的 工程으로 液體燃料, 飼料, 食糧物質 等の 有用한 產物로 變換시켜 化學原料 資源, 에너지 資源 그리고 食糧 資源으로 利用할 수 있을 것이다.

纖維素는 酸 또는 酵素에 의하여 可溶性 產物로 加水分解되나, 過去에 많이 遂行하였던 酸에 의한 加水分解는 粗纖維素와 酸의 相互作用으로 인하여 收率이 낮으며 裝置가 腐蝕되고 加水分解 產物에 不純物이 섞여 있으며 費用이 많이 드는 短點이 있으므로 酵素에 의한 加水分解가 有利한 것으로 밝혀졌다. 天然 纖維素物質은 各기 原料가 다르며 加水分解에 대한 反應性이 다르기 때문에 大部分의 纖維素物質은 前處理가 必要하며 특히 木材纖維素는 生物

學的 分解가 어려운 리그닌과 物理 化學적으로 構成된 複合體이기에 酵素와의 接觸이 어려우므로 前處理가 必要하여 여러가지 物理的, 化學的 前處理에 대하여 많은 研究가 행해지고 있으며 그 밖에도 셀룰라아제에 대한 纖維素物質의 反應性, susceptibility에 대하여 많은 研究가 進行되고 있다. 加水分解 收率을 높이기 위한 前處理는 酵素와 接觸할 수 있는 表面을 增加시키고 纖維素의 結晶化度를 낮춰주며 리그닌을 除去해주는 效果가 있어야 한다. 그러나 여러가지의 前處理들은 各기 長短點이 있으며 그중 autohydrolysis는 활엽수와 農産廢棄物에 效果가 크며 費用이 적게 들고 公害를 誘發하지 않는 長點이 있으며 各기의 構成成分으로 分離할 수 있어서 많은 注目을 받고 있다.

따라서 本 實驗에서는 우리나라에 널리 植栽되어 있는 현사시나무와 每年 가치치가를 하여 廢殘材가 생기는 針葉木을 使用하여 autohydrolysis 時間, 2-naphthol 添加, 各 濃度의 dioxane 溶液 處理가 纖維素 基質의 收率, 纖維素基質 內의 殘餘 리그닌 含量, 抽出 可能한 리그닌量, 纖維素基質의 酵素加水分解 後 生成되는 還元糖의 收率에 미치는 影響에 대하여 研究하는데 目的이 있다.

2. 研究 史

셀룰라아제에 관한 研究가 1920年代 Karrer 등¹⁾이 달팽이의 셀룰라아제를 纖維素에 作用시켜 glucose를 檢出한 이래 始作되었는데 Elwyn Reese 등²⁾은 1950 年代 力價가 높고 여러가지 셀룰라아제 成分을 高루 갖춘 셀룰라아제를 分泌하는 *Trichoderma*屬 균주를 固定하였으며, 最近에는 *T. reesei*의 변

이주^{3,4)}와 그 밖의 변이주^{5,6,7,8,9,10)}에 대하여 많은 연구가 행해지고 있다. 纖維素의 酵素加水分解 mechanism이 아직까지도 正確히 究明되지는 않았으나 셀룰라아제는 endo- β -glucanase(C_x), exo- β -glucanase(C_1)와 cellobiase인 β -glucosidase가 서로 協同적으로 作用하여 glucose 등으로 分解한다고 Reese¹¹⁾, Eriksson 등¹²⁾이 發表하였으며 纖維素糖化에 影響하는 主要因子에 대하여 Elder 등¹³⁾은 反應基質의 特性, enzyme systems 등이 있다고 하였다. 反應基質의 性質에 대하여 Cowling¹⁴⁾은 加水分解가 잘 이뤄지기 위해서는 加水分解시키는 強酸이나 酵素에 얼마나 잘 接觸할 수 있느냐에 달려 있으며 細胞膜成分의 構造的 性質, 含水率, gross capillaries의 크기나 表面性質, 纖維素의 結晶化度, 單位細胞의 크기, anhydroglucose unit의 모양과 安定性, 重合度, 纖維素에 結合된 物質의 性質에 影響을 받는다고 하였다. Millet 등¹⁵⁾은 纖維素糖化에 미치는 物理的, 化學的 前處理의 影響에 대하여 리그닌과 纖維素의 結晶化가 纖維素糖化에 妨害가 되므로 脫리그닌시키거나 lignin-carbohydrate complex를 開裂시키도록 前處理를 해야 하며 潤葉樹는 리그닌 總量의 1/3만 脫리그닌 시켜도 되나, 針葉樹는 2/3 이상을 脫리그닌 시켜야 家畜이 60% 程度 消化, 利用할 수 있다고 하였으며 前處理에는 hammer mill, colloid mill, ball mill, two-roll mill에 의한 物理的 處理方法과 蒸氣爆碎法, alkali swelling方法 脫리그닌法, 溶解시키거나 沈澱시키는 方法 등의 化學的 方法이 있으며 각기 長短點이 있는 것으로 알려져 있다. Reese¹⁶⁾는 wet milling에 의하여 理論值의 100%에 가까운 glucose를 얻을 수 있으나 酵素反應系에서 酵素의 不活性化를 일으킬 念慮가 있다고 하였다. Tassinari 등¹⁷⁾은 differential speed two roll milling을 하였을 때 無處理時 보다 綿은 1,100%, maple chips 1,600%, white pine chips 600%, 신문지는 125%로 각각 還元糖의 生成이 증가되는 매우 效果的인 前處理라고 하였다. Gharpuray 등¹⁸⁾은 여러가지 前處理를 連續적으로 한다고 해도 加水分解 速度가 單一前處理보다 大部分 빠르지 못하며 ball milling은 specific surface area (SSA) 증가와 crystallinity index (CrI) 감소에 效果的이며 에렌첵 굴리클은 SSA 증가와 脫리그닌에 매우 效果的이며 過硝酸은 脫리그닌에 效果的이라고 하였다. Kelsey 등¹⁹⁾은 whatman CF-11 cellulose, 신문지, black cotton wood, white pine

心材 등은 無處理보다 ball milling으로 前處理했을 경우 48時間後 2배의 還元糖이 生成되며, wet milling은 5배의 還元糖이 生成된다고 하였으며 Mandel 등²⁰⁾은 신문지를 使用하여 前處理를 한 結果 hammer milling, fluid energy milling, colloid milling, alkali 處理보다 ball milling의 效果가 컸다고 하였다. Seeta 등²¹⁾은 baggasse에 48時間 동안 뜨거운 1N NaOH를 處理한 後 HCl로 中和했을 때 63%, 7kg/m²의 加壓蒸氣를 處理했을 때 59%의 糖化率을 얻을 수 있다고 하였다. Douglas 등²²⁾은 無處理時 20%의 還元糖이 生成했으나 150°C에서 2% NaOH를 處理했을 때 5分後 corn stover의 65%가 溶解되었으며 52%의 還元糖을 얻을 수 있었다고 하였다. Knappert 등²³⁾은 포플라를 黃酸으로 前處理하고 glucose收率을 증가시키기 위해서는 180°C 以上の 溫度로 處理하여야 한다고 하였다. Kamakura 등²⁴⁾은 신문지의 加水分解에 있어서 pre-irradiation의 照射量 증가에 따라 酵素加水分解 速度를 증가시키며 還元糖收率을 증가시킨다고 하였다. Han 등²⁵⁾은 여러가지 膨潤劑로 處理한 後 ⁶⁰Co나 ¹³⁷Cs로부터의 γ -線을 照射했을 때 50 Mrad 以上 照射時 高度로 分解되었으며 물에 完全히 溶解하였다고 하였다. Kamakura 등²⁶⁾은 纖維素基質의 酵素糖化에 의한 glucose收率은 irradiation에 의한 preliminary decomposition이 증가할수록 증가한다고 하였으며 Sasaki 등²⁷⁾은 縮纖維素粉末을 60% 黃酸, Cadoxen과 DMSO-p-formaldehyde를 溶媒로 處理한 後 冷 aceton으로 溶解纖維素를 97% 이상 回收할 수 있었으며 X-線 廻折도와 酵素에 對한 susceptibility가 깊은 관계가 있다고 하였다. Fan 등²⁸⁾은 纖維素의 酵素加水分解에 크게 影響을 미치는 것은 纖維素의 構造的 特徵이며 纖維素 fiber의 膨潤程度, 纖維素의 分子構造, 纖維素의 結晶化度, 리그닌같은 結合物質의 量, 重合度, 纖維素 fiber의 表面積 등이 있다고 하였다. Lee 등²⁹⁾은 纖維素反應速度에 影響하는 因子로 基質의 構造的 特徵(結晶化度, 比表面積, 重合度 등), 셀룰라아제의 吸着, product inhibition, 셀룰라아제의 不活性化 등이 있다고 하였다. Fan 등³⁰⁾은 밀짚을 基質로 하였을 때 加水分解 速度는 結晶化度, 리그닌含量에 의하여 影響을 받으며 脫리그닌이 증가될수록 加水分解가 잘되는 것은 原來 리그닌의 50%가 脫리그닌될 때까지이며 그 以上에서는 변하지 않는다고 하였다. 여러가지 前處理 중 木材를 단순

히 물과 함께 高温, 高壓下에서 前處理함으로써 公害問題, 生産費 등에 有利하며 木材 主要構成分을 效果的으로 分離할 수 있고 酵素加水分解에 있어서 前處理效果를 높일 수 있는 autohydrolysis에 대하여 Bender 등³¹⁾은 潤葉樹에 단순히 蒸煮處理만을 해도 中級 乾草(medium grade hay)에 맞먹는 消化率로 증가시킬 수 있다고 하였으며 Lora 등³²⁾은 175-220 °C에서 포플라를 autohydrolysis한 後 液體 dioxane 또는 NaOH 抽出時에 상당한 量의 리그닌이 溶出되며 最大의 리그닌 추출은 autohydrolysis 時間과 反應溫度에 影響을 받으며 오랜 反應時間은 오히려 리그닌을 溶出하기 어렵게 한다고 하였다. Wayman 등³³⁾은 포플라의 autohydrolysis 中에 芳香族化合物의 添加가 리그닌의 自己縮合을 阻害하며 그 中 2-naphthol의 效果가 가장 컸으며 處理時間 溫度, 2-naphthol 量의 증가에 따라 溶出되는 리그닌의 量이 증가하였다고 하였으며 Wayman 등³⁴⁾은 포플라를 2-naphthol 存在下에서 脫리그닌시켰을 때 2개의 相異한 1次反應을 가지며 그것은 "bulk delignification"과 "residual delignification"의 存在를 나타내며 bulk delignification 反應의 活性에너지는 122.6 KJ/mole 이라고 하였다. Shimizu 등³⁵⁾은 加壓下에서 autohydrolysis가 여러 樹種의 酵素 susceptibility에 미치는 影響과 hemicellulose, 리그닌의 溶解에 미치는 影響을 研究하였다.

그러나 아직 國內 樹種中 현사시나무와 잣나무를 使用한 autohydrolysis 研究와 2-naphthol의 리그닌 self condensation 抑制效果, dioxane 溶液의 處理가 脫리그닌에 미치는 影響, 그리고 각각의 條件이 還元糖收率에 미치는 影響에 대한 研究가 未始한 實情이다.

3. 材料 및 方法

3.1. 實驗材料

3.1.1. 供試樹種

현사시나무는 경기도 수원 오목리 所在 山林廳 林木育種研究所에서, 잣나무는 경기도 도척 서울대학교 농과대학 부속 中部研習林에서 분양받아 供試樹種으로 하였으며 供試樹種의 特性은 表1과 같다.

3.1.2. 木粉의 調製

각 樹種을 伐採 後 嵩고 높이에서 2 m 길이의 原木을 採取하여 採取한 原木을 chain saw로 4분절

Table 1. Characteristics of Sample Trees

Species	<i>Populus alba-glandulosa</i>	<i>Pinus koraiensis</i> S. et Z.
Age	27 yr.	17 yr.
Height	17.7 m	7.4 m
D.B.H.	27 cm	12 cm
Number	1	1
M.C.*	41.5 %	51.2 %

* percentage based on green weight at laboratory after felling.

Table 2. Chemical Composition of Wood Meals

Species	<i>Populus alba-glandulosa</i>	<i>Pinus koraiensis</i>
M. C.	10.9 % *	10.8 %
Extractives		
Cold Water	2.6 %	2.8 %
Hot Water	3.3 %	4.5 %
CH ₂ Cl ₂	1.2 %	2.1 %
Alcohol-benzene	2.8 %	3.0 %
Ash	0.33 %	0.23 %
Holocellulose	80.9 %	73.0 %
Klason Lignin	20.2 %	26.7 %

* All values are the averages of 3 replications.

한 後, 둥근톱을 使用하여 톱밥을 낸 뒤 Wiley-mill을 使用하여 粉碎하고 40-60 mesh의 木粉을 얻어 氣乾시켰다. 木粉의 化學的 組成은 表2와 같다.

3.1.3. 木粉의 前處理

木粉을 酵素加水分解에 알맞도록 變化시켜 주기 위한 前處理는 表3과 같다.

3.1.3.1. Autohydrolysis

현사시나무 氣乾木粉 500 g을 6 ℓ stainless-steel digester에서 液比를 1 : 6(木粉 : 물)으로 하여 木粉 全乾重量의 2%에 해당하는 2-naphthol을 處理하고 180 °C에서 30分間 autohydrolysis시켰으며, 현사시나무와 잣나무 氣乾木粉 500 g을 각각 液比 1 : 7로 하여 180 °C에서 60分間 2%의 2-naphthol을 處理하고 autohydrolysis시켰다. 이때 溫度到達時間은 60분으로 하였다.

3.1.3.2. 리그닌 抽出

Autohydrolysis 後 木粉을 70 °C에서 2時間동안 물로 洗滌하고 계속해서 물로 稀釋한 100%, 90%, 75%와 50% dioxane 溶液으로 70 °C에서 4時間 동안 각각 抽出하였다.

Table 3. Conditions of pretreatments

Species	Autohydrolysis			Extraction	
	Temp. (°C)	Liquor ratio	Time (min.)	2-Naphthol (%)	Dioxane (%)
<i>Populus alba-glandulosa</i>	180	1 : 6	30	0	100*
					90
		2		75	
				50	
	1 : 7	60	0	100	
				90	
2	75				
	50				
<i>pinus koraiensis</i>	180	1 : 7	60	0	100
					90
				2	75
					50

*dilution with water.

3. 1. 4. 셀룰라아제

셀룰라아제는 *Trichoderma viride* 로부터 分泌된 粉末狀의 商業的 crude enzyme 을 T 化하오로 부터 분양받아 使用하였다. 實驗에 使用할 때에는 酵素를 最適 pH의 0.05M citrate buffer 에 녹여 酵素濃度를 1% (w/v) 로 하여 最適 溫度에서 纖維素基質에 反應시켰다.

3. 2. 實驗方法

3. 2. 1. 供試樹種의 成分分析

供試樹種의 含水率, 冷水抽出物, 温水抽出物, dichloro methane 抽出物, alcohol-benzene 抽出物 ash 含量, Klason lignin 含量을 TAPPI Standard 에 의하여, holocellulose 를 Wise's method 로 分析하였다.

3. 2. 2. 前處理 後 纖維素基質의 成分分析

3. 2. 2. 1. Autohydrolysis 後의 成分分析

木粉을 autohydrolysis 한 後 成分變化와 殘餘木粉의 收率을 알아보기 위하여 holocellulose, Klason lignin 含量을 위와 같은 方法으로 定量하였으며 收率을 구하였다.

3. 2. 2. 2. 리그닌 抽出 後의 成分分析

Autohydrolysis 後 木粉을 각각 dioxane 溶液으로 리그닌을 抽出한 후 含水率을 測定하고 收率을 구하였으며 holocellulose, Klason lignin 含量을 위와 같은 方法으로 定量하였다.

3. 2. 3. 셀룰라아제의 最適反應條件

纖維素基質에 作用시킬 때 酵素의 最適條件을 決定하기 위하여 最適 pH와 最適溫度를 검토하였다.

3. 2. 3. 1. 最適 pH

T. viride 의 酵素는 pH 安定性的 範圍가 4.0에서 6.0 사이라고 알려져 있으나³⁶⁾ 本實驗에 있어서 最適 pH를 알아내기 위하여 carboxy methyl cellulose (CMC) 를 基質로 하여 각 pH 條件에서 糖化率을 比較하여 最適 pH를 決定하였다. 1% (w/v) CMC 基質 1.0ml와 각 pH의 citrate buffer에 녹인 1% (w/v) 酵素液 1.0 ml를 50 °C에서 25 rpm으로 振盪시키며 30 분동안 酵素加水分解하고 3.0 ml의 dinitrosalicylic acid (DNS) 試藥을 가하여 끓는 물에서 15분간 加熱 發色시켜 550 nm에서 比色定量하였다. 그 結果 그림 1과 같이 弱酸性인 pH 5.0에서 最大의 糖化率을 나타내었으며 그보다 낮거나 높은 pH에서는 糖化率이 떨어졌다. 따라서 纖維素基質을 酵素加水分解할 때 pH를 5.0으로 決定하였다.

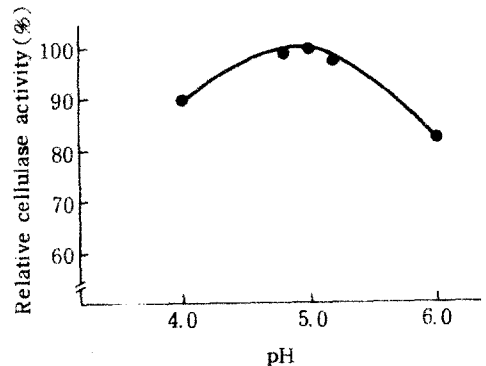


Fig. 1. Effect of pH on the activity of crude cellulase from *Trichoderma viride*. (1.0 ml of the enzyme reacted on 1% CMC at 50 °C for 30 minutes)

3.2.3.2. 最適溫度

*T. viride*의 효소는 온도안정성의範圍가 40 °C에서 50 °C 사이라고 알려져 있으나³⁰⁾, 本實驗에 있어서의 最適溫度를 알아내기 위하여 CMC를 基質로 하여 糖化率을 比較하였다. 1% (w/v) CMC 基質 1.0 ml와 pH 5.0의 citrate buffer에 녹인 1% (w/v) 효소액 1.0 ml를 각 溫度에서 25rpm으로 振盪시키며 30分 동안 효소加水分解하고 3.0 ml의 DNS 試藥으로 發色시켜 550 nm에서 比色定量하였다. 그 結果 그림 2와 같이 50 °C일 때 最大의 糖化率을 나타내었으며 그보다 낮거나 높은 溫度에서는 糖化率이 떨어졌다. 따라서 纖維素基質을 효소加水分解할 때 溫度를 50 °C로 決定하였다.

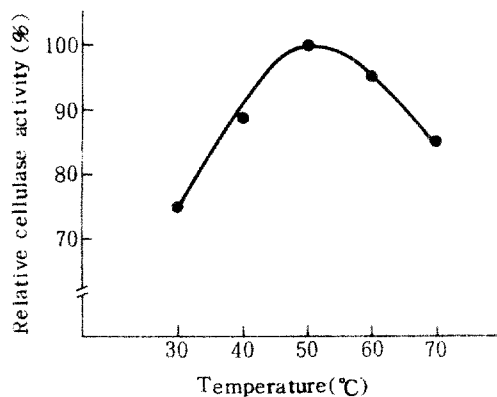


Fig. 2. Effect of temperature on the activity of crude cellulase from *Trichoderma viride*. (1.0 ml of the enzyme reacted on 1% CMC at pH 5.0 for 30 minutes)

3.2.4. Glucose 標準檢量線 作成

효소의 力價, 還元糖 定量을 위하여 glucose로 標準檢量線을 作成하였다. glucose 濃度를 變化시켜 가면서 glucose 溶液 1.0 ml, 1% (w/v) 효소액 1.0 ml를 pH 5.0, 50 °C에서 反應시킨 後 위와 같은 方法으로 比色定量하여 glucose 標準檢量線을 作成한 結果 그림 3과 같았다.

3.2.5. 효소 力價 測定

효소의 力價를 測定하기 위하여 filter paper, CMC로부터 生成되는 還元糖을 DNS法으로 比色定量하였으며 分當 1 μ mole을 生成할 수 있는 효소의 力價를 1 Unit로 하였다.

3.2.5.1. Exo-glucanases (C_1)의 力價

Whatman No. 1 filter paper 50mg (1×6cm 정도)

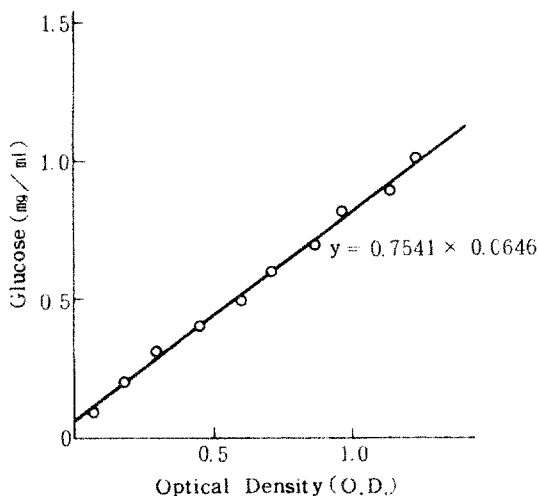


Fig. 3. Calibration curve of glucose.

을 잘라 접어서 1.0 ml의 증류수를 넣고 pH 5.0의 citrate buffer에 녹인 1% (w/v) 효소액 1.0 ml와 함께 50 °C에서 1시간동안 作用시킨 後 DNS 3.0 ml를 加하고 끓는 물에서 15분간 加熱하여 發色시킨 後 生成된 還元糖을 550 nm에서 比色定量하여 力價를 구한 結果 40 mU 이었다.

3.2.5.2. Endo-glucanases (C_x)의 力價

1% CMC 1.0 ml溶液에 pH 5.0의 citrate buffer에 녹인 1% (w/v) 효소액 1.0 ml를 넣어 30分間 50 °C에서 作用시킨 後 위와 같은 定量하여 力價를 구한 結果 69 mU 이었다.

3.2.6. 纖維素基質의 효소加水分解

木分을 前處理한 後 증류수를 가하여 1% (w/v)의 纖維素基質 溶液을 pH 5.0의 citrate buffer에 녹인 1% (w/v) 효소액 1.0 ml와 50 °C에서 50 rpm으로 振盪시키며 1時間동안 효소加水分解하고 위와 같은 方法으로 定量하였다.

3.2.7. 糖化液의 糖類分析

TAPPI Standard T 249pm-75에 의하여 調製한 試料를 3% ECNSS-M을 液狀으로 表面固着시킨 Gas chrom Q 100/200mesh를 充填한 316 stainless steel column을 使用하였으며 detector는 FID를 使用하여 Hewlett Packard社의 5840 A Gas chromatograph에 의하여 糖化液의 糖類를 分析하였다.

이때 column의 溫度는 190 °C로 一定하게 하였고 injection port 溫度는 200 °C, detector 溫度는 250 °C로 하였으며 carrier gas는 helium gas

를 使用하였으며 20 cm/min의 流速으로 하였다.

4. 結果 및 考察

4.1. 木粉의 前處理 後 成分分析

氣乾 木粉 500 g을 180 °C의 高溫, 高壓下에서

물과 함께 autohydrolysis 시키고 나서 물로 洗滌한 다음의 木粉 收率과 化學的 成分은 表 4와 같았다.

현사시나무의 木粉 收率は 30分間 autohydrolysis 한 경우 2-naphthol 無處理時 64%, 處理時 66%이었고 60分間 autohydrolysis 한 경우 2-naphthol 無處理時 62%, 處理時 64%이었다. 잣

Table 4. Yield and chemical composition of cellulosic materials after autohydrolysis

Species	Time (min)	2-naphthol (%)	M. C. (%)	Yield (%)	Holocellulose (%)	Klason lignin (%)
<i>populus alba-glandulosa</i>	30	0	12.7	63.8	72.1	28.3
		2	9.6	65.5	71.9	29.6
	60	0	13.9	62.1	69.3	29.6
		2	4.6	63.9	68.4	30.2
<i>pinus koraiensis</i>	60	0	10.6	69.9	61.3	39.0
		2	19.9	70.4	61.3	42.8

나무의 收率は 60分間 autohydrolysis 한 경우 2-naphthol 無處理 및 處理時 모두 70%이었다. 따라서 현사시나무의 경우 autohydrolysis 時間이 증가함에 따라 收率は 감소하였고 2-naphthol을 處理한 경우가 無處理 경우보다 收率が 減少하였다. 그러나 잣나무의 경우 2-naphthol을 處理한 경우가 無處理 경우보다 收率が 減少하였다. 그러나 잣나무의 경우 2-naphthol을 處理한 경우와 無處理의 경우 같은 收率을 나타내었다.

현사시나무의 holocellulose는 2-naphthol 無處理時 autohydrolysis 30分 後 原來 holocellulose의 43%, 60分 後 原來의 47%가 溶出하였으며 (그림 4), 2-naphthol 處理時 autohydrolysis 30分 後 原來 holocellulose의 42%, 60分 後 46%가 溶出하였다. 잣나무의 holocellulose는 60分間 autohydrolysis 할 때 2-naphthol 無處理時와 處理時 모두 原來의 41%가 溶出하였다. 따라서 autohydrolysis 時 初期 30分 동안에 大部分의 hemicellulose가 溶出되었다고 생각된다. 이와같은 現象을 Shimizu 등³⁷⁾은 原來의 acetylated-hemicellulose가 물과 함께 加熱됨으로써 醋酸이 生成되어 加水分解에 觸媒作用을 하여 hemicellulose가 溶出되는 것이라고 說明하고 있다.

Autohydrolysis 한 後의 殘餘 木粉에 存在하는 Klason lignin 含量은 현사시나무의 경우 原來 Klason lignin 含量의 90~96%가 殘存하였으며, 잣나무의 경우 거의 大部分의 Klason lignin이 殘存하였다. 이와 같이 autohydrolysis 後 大部分의 리

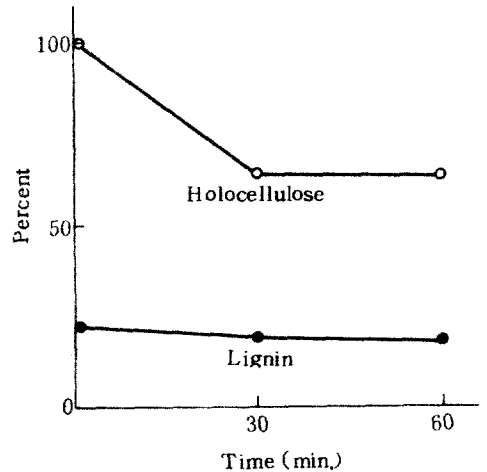


Fig. 4. Changes of major components of *Populus alba-glandulosa* wood meals after autohydrolysis at 180 °C without 2-naphthol.

그닌이 殘存하는 것은 Shimizu 등³⁷⁾의 結果와 一致하였다. 현사시나무의 木粉에 殘存하는 리그닌에 dioxane 溶液을 處理하면 相當量의 리그닌이 溶出되었으나 잣나무의 木粉에 殘存하는 리그닌은 거의 溶出되지 않았다. Shimizu 등³⁷⁾도 dioxane 溶液으로 處理했을 때 針葉樹보다 闊葉樹가 많이 脫리그닌되었다고 發表하였다.

Dioxane 溶液으로 處理한 後 纖維素基質의 收率 (表 5)에 있어서 autohydrolysis 한 後의 殘餘木粉을 基準으로 할 때 현사시나무는 71~87%, 잣나

Table 5. Yield, Klason lignin Contents, extractable lignin and reducing sugar yield of cellulosic substrates after dioxane extraction

Species	Pretreatments						Extractable lignin* (%)	Reducing sugar yield** (%)
	Autohydrolysis		Extraction					
	Time (min.)	2-naphthol (%)	Dioxane (%)	M.C. (%)	Yield (%)	Klason lignin (%)		
<i>Populus alba-glandulosa</i>	30	0	100	7.0	81.8	17.1	50.6	10.3
			90	8.0	83.8	16.5	51.1	11.3
			75	7.4	80.0	16.2	54.3	10.5
			50	8.0	86.4	19.7	39.6	11.4
		2	100	8.4	77.3	13.6	64.3	10.9
			90	8.4	79.6	13.3	64.1	11.2
	75		6.9	75.1	13.3	66.4	11.3	
	50		7.9	83.3	16.8	52.6	11.9	
	60	0	100	6.4	80.4	14.9	59.4	12.0
			90	7.8	80.6	15.1	58.9	13.3
			75	6.7	77.4	14.7	61.4	12.0
			50	7.0	85.6	17.2	50.2	12.9
2		100	8.1	77.1	12.1	69.1	12.5	
		90	6.9	70.6	10.7	75.1	11.5	
	75	7.7	76.3	10.6	73.2	12.8		
	50	6.4	78.0	16.4	56.8	12.5		
<i>Pinus koraiensis</i>	60	0	100	9.1	94.3	35.2	15.0	10.5
			90	7.5	85.9	33.8	21.3	9.0
			75	0.2	94.6	36.6	11.0	9.2
			50	7.2	92.5	35.7	17.7	8.6
		2	100	8.8	87.9	36.6	24.9	9.3
			90	7.4	83.9	36.5	28.4	8.6
	75		9.2	91.9	36.4	22.0	9.1	
	50		6.6	87.5	37.4	23.4	8.7	

* Percentage of lignin extracted with dioxane based on Klason lignin in the autohydrolyzed wood meals.

** Reducing sugar yield of moisture free cellulosic substrates after enzymatic hydrolysis.

무는 81~98%이었다. 현사시나무의 경우 收率에 있어서 autohydrolysis 時間의 效果가 F-test를 한 結果 有意性이 있었으며 時間이 증가할 때 감소하였으며, 2-naphthol의 效果가 高度로 有意하여 2-naphthol을 處理할 때 감소하였으며, dioxane 溶液의 處理效果가 高度로 有意하였고 50% dioxane 溶液 處理時 가장 높았으며 100%, 90%, 75% dioxane 溶液 處理時 收率間 차이는 없었다. 잣나무의 경우 2-naphthol의 效果는 有意性이 없었으며 dioxane 溶液 處理效果는 有意性이 있었으며 90% dioxane 溶液으로 處理했을 때 낮았고 100%, 75%, 50% dioxane 溶液 處理時 높았으나 100%, 75%, 50% dioxane 溶液 處理 각각의 收率間에는

差異가 없었다.

Dioxane 溶液으로 處理한 後의 收率은 大部分 脫리그닌의 程度와 密接한 關係가 있어서, dioxane 溶液에 의하여 脫리그닌이 많이 되는 경우 收率が 낮으며 脫리그닌이 적게 되는 경우 收率が 높았다. dioxane 溶液으로 處理한 後의 Klason lignin 含量(表 5)은 현사시나무의 경우 autohydrolysis 時間이 30분에서 60분으로 증가함에 따라 16%에서 14%로 감소하였고, 2-naphthol을 處理한 경우 13%, 無處理의 경우 17%로 2-naphthol을 處理한 경우 Klason lignin 含量이 적었다. Dioxane의 處理效果가 高度로 有意하였으며 90%, 75% dioxane 溶液處理時 Klason lignin 含量이 적었고 100%,

50% dioxane 溶液處理時 Klason lignin 含量이 많았으나 90%, 75% dioxane 溶液處理 각각의 Klason lignin 含量에는 差異가 없었다. 그러나 autohydrolysis 時間, 2-naphthol, dioxane 抽出등의 相互作用 效果가 高度로 有意하였다. 잣나무의 경우 Klason lignin 含量이 33~38% 이었으나 2-naphthol 을 處理한 경우 더 많았으며, dioxane 處理 效果의 有意성은 없었다. Dioxane 溶液으로 抽出할 수 있는 Klason lignin 量(表 5)은 autohydrolysis 後의 殘餘 木粉의 Klason lignin 含量을 基準으로 할 때 현사시나무의 경우 40~75%까지 脫리그닌할 수 있었으며 잣나무의 경우 11~28%까지 脫리그닌할 수 있었다. Dioxane 溶液으로 抽出할 수 있는 Klason lignin 含量은 현사시나무의 경우 處理時間이 증가함에 따라 30분일 때 55%에서 60분일 때 63%로 증가하였으며 2-naphthol 을 處理한 경우 65%, 無處理의 경우 53%로 處理한 경우 더욱 많이 脫리그닌되었다. Dioxane 溶液의 處理效果도 高度로 有意하였고 90%, 75% dioxane 溶液으로 處理했을 때 가장 많이 脫리그닌되었으나 90%, 75% dioxane 溶液處理 後 脫리그닌되는 程度 間에는 有意差가 認定되지 않았으며 50% dioxane 溶液 處理時 가장 적게 脫리그닌되었다. 따라서 현사시나무의 가장 效果的인 脫리그닌 方法은 2-naphthol 을 處理하고 60分間 autohydrolysis 한 다음 90% dioxane 溶液으로 脫리그닌하는 方法이었으며 autohydrolysis 後 얻은 木粉의 Klason lignin 含量中 75% 다시말하면 原來 木粉의 Klason lignin 含量中 76%까지 脫리그닌할 수 있었다. 잣나무의 경우 2-naphthol 을 處理한 경우 autohydrolysis 後 木粉에 殘存하는 Klason lignin 含量을 基準으로 하여 25% 無處理의 경우 16%로 2-naphthol 을 處理한 경우 더욱 많이 脫리그닌되었고 100%, 90% 50% dioxane 溶液으로 處理한 경우보다 75% dioxane 溶液으로 處理한 경우 脫리그닌이 적게 되었다. 따라서 潤葉樹인 현사시나무를 autohydrolysis 後 dioxane 으로 脫리그닌했을 때 매우 效果的이었으나 針葉樹인 잣나무는 效果가 적었다.

4.2. 纖維素 基質의 酵素加水分解

木粉을 前處理한 後 셀룰라아제에 의하여 加水分解한 結果는 表 5와 같았으며, 현사시나무의 경우 2-naphthol 을 處理하지 않고 30分間 autohydrolysis 시켜 加水分解할 때 10.3~11.4%의 糖化率

로 나타났으며, 2-naphthol 을 處理하고 30分間 autohydrolysis 한 경우 10.9~11.9%의 糖化率로 나타났으며, 2-naphthol 을 處理하지 않고 60分間 autohydrolysis 시킨 경우 12.0~13.3%의 糖化率로 나타났으며 2-naphthol 을 處理하고 60分間 autohydrolysis 시킨 경우 11.5~12.8%의 糖化率로 나타났다. 따라서 현사시나무의 경우 autohydrolysis 時間이 증가할수록 糖化率이 증가하였으나 2-naphthol 과 dioxane 處理의 效果는 없었다. 잣나무의 경우 2-naphthol 을 處理하지 않고 60分間 autohydrolysis 한 경우 8.5~10.5%의 糖化率로 나타났으며, 2-naphthol 을 處理하고 60分間 autohydrolysis 한 경우 8.6~9.3%의 糖化率로 나타났다. 따라서 잣나무의 경우 2-naphthol 의 效果는 없었으나 dioxane 處理의 效果는 有意성이 認定되었으며 50% dioxane 溶液 處理時 가장 낮았다.

4.3. 糖化液의 糖類分析

糖化液의 定性 및 定量分析은 單糖類인 glucose, xylose, mannose 의 組成이 각각 다른 5개의 標準溶液에 의하여 實施하였는데 各成分의 含量은 表 6에 나타내었다.

그리고 各構成糖類에 對한 補正係數는 標準溶液內의 各成分含量과 各成分의 peak area의 面積과

Table 6. The compositions of the standards

Mono-saccharides	Standard component				
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
glucose	231	219	213	225	238 *
xylose	7	19	25	13	3
mannose	5	15	20	10	0

* Units = mg

Table 7. The monosaccharides(%) in the hydrolyzates after enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates which was autohydrolyzed at 180°C for 60 minutes with 2% 2-naphthol and was then extracted the lignin with 75% dioxane solutions at 70°C for 4 hours

	<i>Populus alba</i> · <i>glandulosa</i>		<i>Pinus koraiensis</i>
glucose	89.6		92.0
xylose	7.3		8.0
mannose	3.1		-

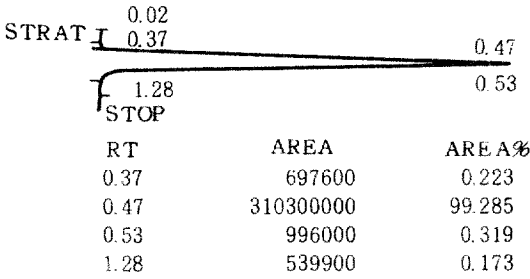


Fig. 5. Typical chromatogram of hydrolyzate from *Populus alba glandulosa*.

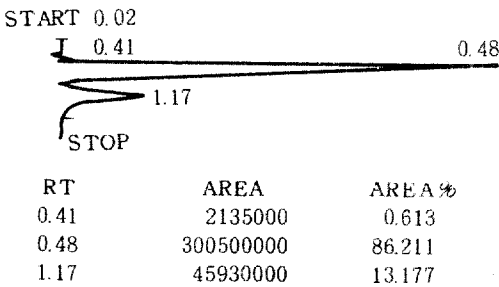


Fig. 6. Typical chromatogram of hydrolyzate from *Pinus koraiensis*.

内部標準物質인 inositol의 peak area比를 使用하였다.

酵素加水分解後生成된還元糖의糖類를分析한結果表7과 같았다.

5. 結 論

우리나라에 널리 植栽된 현사시나무와 잣나무를 供試樹種으로 하여 autohydrolysis 處理에 의한 木材 主要構成分의 分離效果를 究明하기 위하여 纖維素基質의 收率을 分析하였으며, 180℃로 autohydrolysis 한 時間, 2-naphthol 添加, dioxane 抽出이 脫리그닌에 미치는 影響과 最適 脫리그닌 處理를 究明하였으며 이들 處理가 cellulase 에 의한 還元糖生成量에 미치는 影響을 分析한 結果는 다음과 같았다.

(1) 180℃에서 autohydrolysis 하였을 때, 현사시나무는 本實驗範圍內에서 autohydrolysis 時間이 증가할 때 殘存 木粉의 收率이 감소하였으며, 2-naphthol 添加의 경우 收率이 감소하였고, 잣나무는 2-naphthol 添加의 경우와 無添加의 경우 收率間 차이가 없었다.

(2) 180℃에서 autohydrolysis 한 後 dioxane 溶液으로 抽出한 경우, 현사시나무는 autohydrolysis 時間이 증가할 때 纖維素基質의 收率이 감소하였으며, 2-naphthol 添加의 경우 收率이 감소하였고, 50% dioxane 溶液 抽出時 收率이 가장 높았으며, 잣나무는 2-naphthol 添加時와 無添加時의 收率間 차이가 없었으며, 90% dioxane 溶液 抽出時 收率의 가장 낮았다.

(3) 180℃에서 autohydrolysis 한 後 dioxane 溶液으로 抽出한 경우, 현사시나무는 autohydrolysis 時間이 증가할 때 纖維素基質內의 Klason lignin 含量은 감소하였고 2-naphthol 添加의 경우 Klason lignin 含量이 감소하였으며, 90%, 75% dioxane 抽出時 Klason lignin 含量이 가장 적었으며 autohydrolysis 時間, 2-naphthol 添加, dioxane 抽出의 相互作用 效果도 컸다. 잣나무는 2-naphthol 을 添加했을 때 無添加時보다 오히려 Klason lignin 含量이 많았으며 dioxane 抽出效果는 없었다.

(4) Autohydrolysis 한 後 dioxane 溶液으로 抽出한 경우, 현사시나무는 autohydrolysis 時間의 증가와 2-naphthol 添加에 따라 dioxane 溶液으로 抽出할 수 있는 Klason lignin 含量이 많았으며, 90% 75% dioxane 抽出時 가장 많이 脫리그닌 되었다. 잣나무는 2-naphthol 無添加時보다 添加時 抽出할 수 있는 Klason lignin 量이 많았으며, 75% dioxane 溶液보다 100%, 90%, 50% dioxane 溶液 抽出時 脫리그닌이 양호하였다.

(5) Autohydrolysis 한 後 dioxane 溶液으로 抽出하고 纖維素基質을 酵素加水分解한 경우, 현사시나무의 還元糖 生成量은 autohydrolysis 時間이 증가할 때 증가하였고 2-naphthol 添加와 dioxane 抽出效果는 없었으나 90%, 75%, 50% dioxane 抽出時 다소 生成量이 많았다. 잣나무의 還元糖 生成量에 있어서 2-naphthol 의 添加效果는 없었으나 dioxane 抽出效果는 있었으며 100% dioxane 抽出時 還元糖 生成量이 가장 많았다.

Literature cited

1. Karrer, P., P. Schubert and W. Wehrli, 1928. Über das Verhalten verschiedener Cellulosen gegen schnecken Cellulase. Helvetica Chim. Acta. 11:229-230.

2. Dewey, D. Y. Ryu. and M. Mary 1980. Cellulase: biosynthesis and applications. *Enzyme Micro. Tech.* 2:91-102.
3. Howell, J. A. and M. Mangat 1978. *Biotech. and Bioeng.* 20:847.
4. Mary, M. and S. David 1976. *Jr. Ferment. Tech.* 54: 267-286.
5. Romanelli, R. A. and C. W. Houston 1975. *Appl. Microbiol.* 30: 276.
6. Stutzonberger, F. J. 1971. *Ibid.* 22:147.
7. Wood, T. M. and D. R. Phillips, 1969. *Nature (London)*. 222:986.
8. Lee, B. H. and T. H. Blackburn 1975. *Appl. Microbiol.* 30:276.
9. Dennis, C. J. 1972. *Gen. Microbiol.* 71:409.
10. King, N. J. and G. A. Smith 1973. *Int. Biodeterior. Bull.* 9:87.
11. Reese, E. T., R. G. H. Siu and H. S. Levinson, 1950. *Jr. Bacteriol.* 59:485.
12. Eriksson, K. E. and K. Larsson, 1975. *Biotech. and Bioeng.* 17:327.
13. Elder, A. L. 1976. In enzymatic conversion of cellulosic materials, technology and applications. *Biotech. and Bioeng.*: 275.
14. Cowling, E. B. 1976. Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. *Biotech. and Bioeng.*: 163.
15. Millett, M. A., A. J. Baker and L. D. Statter. 1976. *Biotech. and Bioeng.* 125-153.
16. Reese, E. T. and M. Mandels. 1980. *Biotech. and Bioeng.* 22: 323-335.
17. Tassinari, T. and M. Macy. 1977. Differential speed two roll mill pretreatment of cellulosic materials for enzymatic hydrolysis. *Ibid.* 19: 1321-1330.
18. Gharpuray, M.M., Y. H. Lee and L. T. Fan. 1983. Structural modification of lignocelluloses by pretreatments to enhance enzymatic hydrolysis. *Ibid.* 25: 157-172.
19. Kelsey, R. G. and F. Shatizadeh 1980. Enhancement of cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis by simultaneous wet milling. *Ibid.* 22: 1025-1036.
20. Mandel, M., L. Hontz, M. Mary, H. Lloyd and N. John 1974. Enzymatic hydrolysis of waste wood. *Ibid.* 16: 1471-1493.
21. Seeta, M. R. and V. Deshpande 1983. *Ibid.* 25: 1863-1871.
22. Douglas, G. M. *et al.* 1983. Alkali treatment of corn stover to improve sugar productidn by enzymatic hydrolysis. *Ibid.* 25: 2067-2076.
23. Knappert, D., H. Grethlein and A. Converse 1981. Partial acid hydrolysis of poplar wood as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Biotech. and Bioeng.* 11: 67-77.
24. Kamakura, M. and I. Kaetsu. 1982. Radiation degradation and the subsequent enzymatic hydrolysis of waste papers. *Biotech. and Bioeng.* 24: 991-997.
25. Han, Y. W., J. Timpa and A. Ciegler. 1981. γ -Ray-induced degradation of lignocellulosic materials. *Ibid.* 23:2525-2535.
26. Kamakura, M. and I. Kaetsu 1978. Radiation-induced decomposition and enzymatic hydrolysis of cellulose. *Ibid.* 20: 1309-1315.
27. Sasaki, T., T. Takashi, N. Nanbu, Y. Sato and K. Kainuma 1979. Correlation between X-ray diffraction measurements of cellulose crystalline structure and the susceptibility to microbial cellulase. *Ibid.* 21: 1031-1042.
28. Fan, L. T., Y. H. Lee and D. R. Beardmore. 1981. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. *Ibid.* 23: 419-424.
29. Lee, S. B., I. H. Kim and H. Taguchi. 1983. Structural properties of cellulose and cellulase reaction mechanims. *Ibid.* 25: 33-51.
30. Fan, L. T., M. M. Gharpuray and Y. H. Lee 1981. Evaluatidn of pretreatments for enzymatic conversion of agricultural residues. *Biotech. and Bioeng.* 11:29-45.
31. Bender, F., Heaney and A. Bowden. 1970. *For. Prod. Jr.* 20(4): 36-41.
32. Lora, J. H. and M. Wayman. 1978. *Tappi.* 61(6): 47-50.
33. Wayman, M. and J. H. Lora. 1978. *Ibid.* 61(6): 55-57.

34. _____, 1979. *Ibid.* 62(9): 113-114.
35. Shimizu, K. and M. Ishihara. 1983. *Agri. Bio. Chem.* 47(5): 949-955.
36. 岡斗植. 1978. Cellulase에 의한 木材糖化에 관한 研究. *韓國林學會誌* 39:57-63.
37. Shimizu, K., K. Sudo, S. Nagasawa and M. Ishihara. 1983. Enzymatic hydrolysis of woods. VII. (Enzymatic susceptibility of autohydrolyzed woods) *Mokuzai Gakkaishi*. 29(6): 428-437.
38. April G. C., M. M. Kamal, J. A. Reddy, G. H. Bowers and S. M. Hansen. 1979. Delignification with aqueous-organic solvents. *Tappi*. 62(5): 83-85